

< Original Article >

## 천연항생제로서 봉독의 기원 및 지표성분 설정

한상미<sup>1\*</sup> · 김정민<sup>1</sup> · 한상훈<sup>2</sup> · 여주홍<sup>1</sup> · 홍인표<sup>1</sup> · 우순옥<sup>1</sup> · 이광길<sup>1</sup> · 권해용<sup>1</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원<sup>1</sup>, 국립축산검역본부<sup>2</sup>

### Origin and effective ingredient standards of honeybee venom as natural antibiotic ingredients

SangMi Han<sup>1\*</sup>, JungMin Kim<sup>1</sup>, SangHoon Han<sup>2</sup>, JooHong Yeo<sup>1</sup>, InPyo Hong<sup>1</sup>,  
SoonOk Woo<sup>1</sup>, KwangGill Lee<sup>1</sup>, HaeYong Kweon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-700, Korea,

<sup>2</sup>Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea

(Received 14 May 2014; revised 23 June 2014; accepted 27 June 2014)

#### Abstract

This research was performed in order to investigate the origin, standard compound, and structural and physical properties of honeybee venom which used as natural antibiotic ingredients to animal. We compared the nucleotide sequence of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (COI) of honeybees were collected from Gangwon, Gyeonggi, Chungnam, Gyeongbuk, Gyeongnam province and Suwon. As major constituent of honeybee venom, melittin was assayed by liquid chromatography. X-ray, differential scanning calorimetry (DSC) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were utilized to examine the structural and physical properties of honeybee venom. Based on the 627bp sequence of COI, *Apis mellifera ligustica* was determined honeybees collected from all six regions. Melittin content varied from 50.7 to 68.6 and averaged 59.8%. According to XRD analysis, honeybee venom showed regular crystal structure peaks at  $2\theta=8.5^\circ$  and  $21.5^\circ$ . DSC showed that the maximum degradation temperature of powder was around  $230^\circ\text{C}$ . Through FT-IR analysis, we could identify cross-linking by the presence of peptide peak at  $1,500\sim 1,600\text{ cm}^{-1}$ . In conclusion, the origin of honeybee venom was *Apis mellifera ligustica* and effective ingredient standards was melittin content varied from 50.7 to 68.6 as natural antibiotic ingredients.

**Key words :** Honeybee venom, *Apis mellifera ligustica*, Melittin, Natural antibacterial agents

## 서 론

가축의 생산성 증진을 위한 사양 관리 중 사료 첨가용 항생제의 사용은 자돈 및 육계, 산란계의 성장 촉진, 사료 효율 개선 및 질병 예방 등에 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 알려져 오랫동안 사용되어 왔다 (Hays와 Muir, 1979). 그러나 항생제의 오남용으로 인한 축산물의 잔류 항생제는 소비자들로의 전이 가능

성과 더불어, 분뇨를 통한 내성 강화 병원균의 발생 가능성을 증가시킴으로써 사회적 문제로 크게 부각되었다(Burgat, 1991; Jung, 2006). 따라서 가축의 생산성에 막대한 영향을 미치던 항생제의 사용이 2011년 7월 이후 전면 금지됨으로 인하여 축산 농가에서는 이를 대체할 수 있는 천연항생제의 개발에 대한 관심이 증가되고 있다.

순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 및 면역증강 등의 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래전부터 관절염, 통

\*Corresponding author: SangMi Han, Tel. +82-31-290-8507,  
Fax. +82-55-82-31-290-8516, E-mail. sangmih@korea.kr

Table 1. Primer sequence of COI gene

Gene		Sequence
COI	Forward	3'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-5'
	Reverse	3'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-5'

풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다(김, 1992; Curcio-Vonlanthen, 1997). 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있는데 이중 펩타이드가 항염증과 항균작용, 강력한 진통작용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려졌다(Habermann과 Reiz, 1965; Piek, 1986). 최근 봉독채집장치와 봉독정제법의 개발로 고순도의 정제 봉독이 생산됨에 따라 동물 및 인체적용 의약품 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 봉독을 자돈 및 양계에 처리했을 때 체중 및 생존율을 증가와 같은 생산성 향상과 질병 감소에 효과를 나타낸다고 보고되었다(Han 등, 2009a, 2009b; Han 등 2010a). 또한, 봉독을 분만 전 교소혈에 투여한 경우 분만 소요시간 단축과 후산 정체를 감소 등 분만효율이 개선되었으며, 발정 재귀일수와 분만간격의 단축과 봉독을 투여한 어미소로부터 출생한 신생송아지의 체중 증가와 질병이 감소하는 것으로 보고되었다(Han 등, 2010b). 뿐만 아니라 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등 유방염 원인균에 의해 유발된 젖소 유방염의 경우 봉독 투여로 체세포수가 크게 감소하는 것으로 확인되었다. 봉독은 유방염에 걸린 젖소로부터 채유한 원유에서 분리한 균에 대해 항균력이 우수한 것으로 보고된바 있다(Han 등, 2007). 그러나 국내에서 판매되는 봉독관련 동물약품은 해외에서 수입된 봉독이며, 국내산 봉독에 대해서는 동물약품의 원료로 사용하기 위한 규격 및 기원 등에 대한 자료가 아직까지 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 현재 축산농가에서 기존항생제 대체제로 사용되고 있는 국내산 봉독의 기원, 성분의 물리화학적 특성을 분석하고 지표물질을 선정하여 천연항생제로 사용하기 위한 동물약품원료 등록의 기초자료로 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 꿀벌 시료 및 DAN 염기서열 분석

국내에서 봉독을 생산하는 농가의 꿀벌 품종 분석

을 위하여 2012년 5월부터 10월까지 100 g 이상의 봉독을 대량 채취하는 양봉농가(강원, 경기, 충남, 경북, 경남)와 연구소 내 양봉장으로부터 일벌과 수벌을 각각 20마리 채집하였다. 채집한 일벌 및 수벌은 ZR Tissue & insect DNA Kit (Zymo Research, Irvine, USA)를 이용하여 genomic DNA 추출하였다. 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 1 ng/ul로 희석하여 PCR을 위한 template DNA로 사용하였다. DNA 증폭은 DNA Thermal Cycler (Takara, Japan)로 수행하였으며, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (COI)의 증폭을 위한 primer는 Table 1과 같다(Lunt 등, 1996). PCR 조건은 94°C에서 1분 동안 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 1분, 45°C에서 1분 30초, 72°C에서 1분 30초로 5회, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분 30초, 72°C에서 1분으로 35 cycle, 마지막으로 72°C에서 5분간 실행하였다. 증폭된 DNA는 1.0% agarose gel에 전기영동하여 확인하였으며, Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Co., USA)을 이용하여 정제하였다. 염기서열 분석은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하였고, 분석된 nucleotide sequence들을 BLAST를 사용하여 GenBank에 등록된 다른 염기서열들과 비교하였다. Phylogeny test 및 tree 제작은 분석 프로그램인 MEGA6 (Tamura 등, 2013)를 이용하였으며, reference sequence는 *Apis mellifera ligustica* (L06178.1)와 outgroup으로 근연종인 *Apis cerana*의 염기서열을 참고하였다.

### 봉독 시료 및 주요성분 분석

2012년 5월부터 10월까지 강원, 경기, 충남, 경북, 경남 지역의 양봉농가 및 연구소 내 양봉장에서 봉독 채집장치를 사용하여 봉독을 채취한 후 봉독의 간이 정제방법(한 등 2007)을 이용 정제하였다. 봉독의 주요성분 분석용으로 멜리틴(Melittin, From bee venom. Sigma, USA)을 사용하였고, 표준품 봉독으로(From *Apis mellifera*, Sigma, USA) 사용하였다. 분석용매로는 ammonium formate, acetonitrile, trifluoroacetic acid와 물은 HPLC용 등급을 사용하였다. 정제 봉독은 액체

크로마토그래피(AKTA explorer, Pharmacia, USA)를 사용하여 확인하였다. Sephadex TM75 및 Source 15RPC ST 컬럼을 사용하였으며, 봉독성분 중에 멜리틴 함량은 아래와 같은 식으로 구하였다.

$$\frac{\text{표준품 취한 양 (mg)} \times \frac{\text{표준품의 순도}}{100}}{\frac{\text{봉독 중의 원하는 성분 피이크 면적}}{\text{표준품의 피이크 면적}}} \times \frac{100}{\text{봉독 취한 양}}$$

**봉독의 물리적 성질 구명**

국내산 봉독의 물리적 구조분석을 위하여 시차열분석(Differential scanning calorimetry; DSC), 적외선 분광광도분석(fourier transform infrared spectroscopy; FT-IR), X선 산란 분석을 수행하였다. 봉독의 시차열 분석은 미국 TA instrument사의 DSC TA 2910을 이용하여 질소 기류하에서 10°C/min의 승온 속도로 50~450°C의 온도 범위내에서 분석하였다. 적외선 분광분석기 Paragon 1000 FT-IR (Perkin Elmer, USA)을 사용하여 적외선 분광분석을 행하였다. 국내산 정제봉독의 결정구조를 파악하기 위하여 X선 산란 분석기 (Small-Angle X-ray scattering with general area detector

diffraction system, Bruker, USA)를 이용하여 X-선 회절 특성을 분석하였다.

**멜리틴 함량에 따른 항균력 검정**

봉독의 멜리틴 함량에 따른 항균력 측정을 위하여 최소성장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 구하였다. 본 연구에서 사용한 균주는 다양한 가축질병의 원인균인 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)를 한국미생물균주은행(서울, 한국)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. aureus*는 trypticase soy (TS) broth (Difco Laboratories, USA)를 사용하여 37°C에서 18시간동안 호기조건으로 배양하여 시험에 사용하였다. 액체배지 희석법에 의한 *S. aureus*에 대한 최저 성장억제농도를 구하였다. 멜리틴 함량이 다른 정제 봉독은 멸균 증류수로 희석한 후 무균 여과하여 액체 배지희석법에 준하여 단계적으로 희석하였다 (Wu와 Hancock, 1999). 대조균으로 페니실린(penicillin, Sigma, USA)을 사용하였다. 각각의 접종 균은 봉독 시료와 함께 18시간 동안 배양한 후 흡수과장 405 nm에서 흡광도를 측정하여 순수배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도로 결정하였다.



**Fig. 1.** Test and construction of maximum likelihood (ML) tree based on partial nucleotide sequence of cytochrome c oxidase subunit I from *Apis mellifera* samples. Honeybee samples were collected in six local apiaries of South Korea. The mitochondrial nucleotide sequences of *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana*, which were used for reference sequences of ingroup and outgroup on the ML test, were obtained from GenBank. GenBank accession numbers were L06178 and GQ162109, respectively. Aligned nucleotide sequences of the gene were 627 base pairs long and Jones-Taylor-Thornton with Frequencies (JTT+F) method was chosen by amino acid substitution model test. In the substitution model, standard genetic code was selected for translation of tested nucleotide sequences. Test of phylogeny was conducted by bootstrap method with 1,000 replication and all gap were used in the analysis. Tree construction method was Neighbor-Joining.

## 결 과

### 염기서열 분석

시그마산 봉독과 동물약품으로 등록된 봉독은 서양종꿀벌(*Apis mellifera*)로부터 채집된 봉독이다. 본 연구에서는 봉독을 대량 채취하는 5개 지역 농가와 시험 양봉장으로부터 채집한 꿀벌의 일벌과 수벌의 total DNA를 순수분리하고 동물의 global bioidentification을 위한 ‘taxon barcode’ gene으로 이용되는 mitochondrial COI gene을 증폭하여 627 bp의 염기서열을 분석하였다. 봉독채집장치를 사용하여 봉독을 채집하는 전국 농가 및 연구소 내 양봉장에서 사육되는 서양종꿀벌은 *A. ligustica*, 이탈리아 품종으로, 시그마산 봉독과 천연물신약으로 등록된 봉독의 기원인 *A. mellifera ligustica*와의 유연관계를 확인하기 위하여 분석된 시료들의 염기서열과 GenBank에 등록되어 있는 *A. mellifera ligustica*의 COI 염기서열을 확보하여 MEGA6로 분석하였다. 그 결과 염기서열 상에서는 99.9% 일치하며, 아미노산 서열상으로는 100% 일치하는 것으로 확인되었다. Fig. 1은 maximum likelihood test를 수행한 결과를 이용하여 Neighbor-Joining tree를 제작한 결과이다. Outgroup으로 사용된 동양종 꿀벌(*A. cerana*)과는 독립된 branch로 갈라지며 국내 봉독생산 농가로부터 채집된 시료들 모두가 *A. mellifera ligustica*와 같은 branch로 묶이며 유전적 거리는 없는 것으로 확인되었다.

### 멜리틴 함량 분석

꿀벌로부터 채취한 시그마산 봉독과 국내에서 봉독 채집장치로부터 채취한 봉독의 멜리틴 함량을 비교 분석하였다. 시그마산 봉독의 멜리틴 함량은 48.7±5.6, 시그마산 봉독의 멜리틴 함량보다는 다소 높게 나타났다(Table 2). 멜리틴 함량은 50에서 68% 범위 내에서 확인되었고, 평균 59.6%였다.

### 물리적 구조 및 열 특성 분석

봉독의 시차열분석 곡선은 Fig. 2A와 같았다. 그림에서 보는 바와 같이 230°C 부근에서 degradation 흡열 피크 발생하는 특성을 갖고 있는 것으로 확인되었

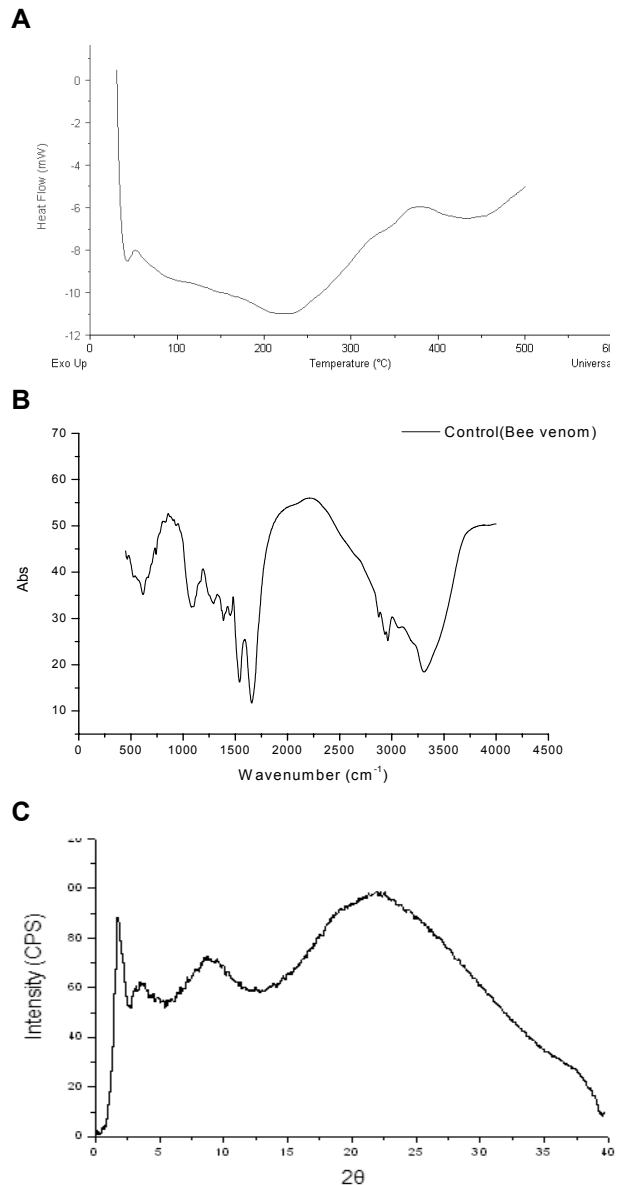


Fig. 2. DSC thermograms (A), FT-IR spectra (B) and X-ray diffractogram (C) of honeybee venom.

Table 2. Melittin contents (%) of honeybee venom sampled in the areas (mean±SE, n=10)

Sigma	Gangwon	Kyonggi	Chungnam	Kyeongbuk	Kyeongnam	Suwon	Average
48.7±5.6	68.6±2.3	58.5±6.5	63.8±3.6	58.7±4.9	57.8±5.6	50.7±8.9	59.6

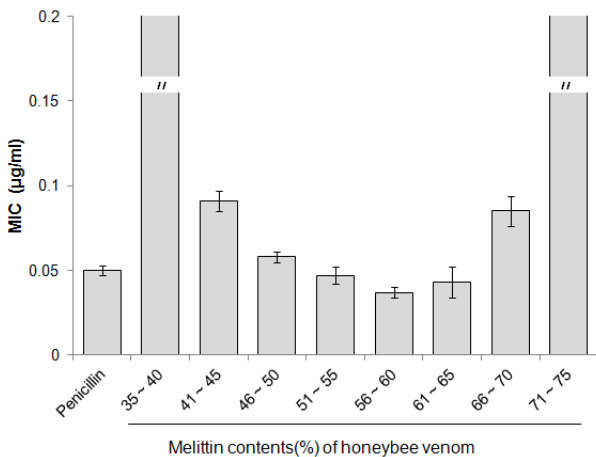


Fig. 3. Minimum inhibitory concentration of honeybee venom according to various concentrations of melittin against *S. aureus*.

다. 적외선 분광광도분석 결과  $1,500\sim 1,600\text{ cm}^{-1}$  대에서 double peak을 보여 peptide 구조 특성을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 봉독의 구조적 특성을 알아보기 위하여 X선 회절 분석 결과,  $2\theta=8.5^\circ$  부근과  $2\theta=21.5^\circ$  부근에서 규칙적인 배열의 결정 피크를 나타내는 특성이 확인되었다(Fig. 2C).

### 멜리틴 함량에 따른 항균력 검증

천연항생제로서 봉독의 지표물질 설정을 위하여 멜리틴 함량이 다른 봉독에 대한 항균력을 검증하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 멜리틴 함량이 51~65%범위인 봉독에서는 페니실린 보다 우수한 항균력을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 41~50% 및 66~70% 범위의 멜리틴 함량을 갖는 봉독 역시 페니실린과 유사한 항균력을 보였다. 그러나 41~45% 및 66~70%에서는 다소 항균력이 떨어지는 것으로 확인되었다.

## 고 찰

봉독은 오래 전부터 인체 및 가축의 질병 치료에 사용되어져 왔으며, 현재에는 천연생리 활성물질로서 만성 염증질환이나 난치성 질환 치료에 효과가 우수하다는 임상연구 사례들이 발표되고 있다(Vick과 Shipman, 1972; Lin, 1987; Kim 등 2012). 현재까지 밝혀진 봉독을 조성하는 물질은 건조봉독의 40% 이상을 차지하는 멜리틴을 비롯한 펩티드 11종, 효소 5종,

생리학적 활성 아민 3종 그리고 비펩티드 성분이 4종으로 알려져 있다(Pick, 1986). 봉독의 주요 생리활성작용으로 항균작용, 항염증 작용, 진통 작용, 면역기능 강화 및 방사선으로부터 보호 작용 등이 보고되어져 있다(Habermann과 Reiz, 1965; Curcio-Vonlanthen, 1997). 주로 한방과 민간요법으로 봉독은 살아있는 꿀벌에서 벌침을 발침하여 환부에 시술하는 생봉독을 직접 활용하는 봉침요법을 사용하고 있으며, 국내에서는 봉독을 채취하여 주사제나 제제화는 제한적으로 이용되고 있는 실정이다(Choi 등, 1999). 지금까지 봉침요법의 경우 숙련된 사용자만이 시술이 가능하며, 일령에 따라 성분과 독량에 차이를 갖고 있어 일정한 성분 및 정량이 어렵다는 단점을 갖고 있다. 또한 살아있는 벌을 사용해야하므로 겨울철과 같이 벌의 사육이 어려운 시기에는 시술에 제한이 따르는 등 여러 가지 문제점으로 인해 축산농가 보급이 활발하게 이루어지지 않았다. 최근, 국내에서 봉독채집장치를 사용하여 봉독 채취가 가능해짐에 따라 채취한 봉독을 가축의 질병 치료 및 예방을 위하여 주사했을 경우 신생태지의 면역력 증강 및 젖소의 유방염 개선 등에 효과가 우수한 것으로 알려져 있어, 축산농가에서 직접 가축의 질병 치료를 위하여 봉독을 사용하고 있다(Han 등 2007; Han 등, 2009a; Han 등, 2009b). 또한, 봉독은 천연항생물질로서 포유동물의 면역계를 자극해서 질병과 성공적으로 싸울 수 있게 한다고 알려져 있는데 이는 유기체의 생체계를 자극하는 것이고, 다음 순서로는 생체의 방어력을 증가시키는 것이다(Lin과 Roger, 1980). 한우 사육농가에서 봉독을 분만 전 어미소의 교소혈에 투여한 경우 분만 소요시간 단축과 후산정체율 감소 등 분만효율이 개선되었으며, 발정재귀일수와 분만간격이 단축되는 것으로 나타나 기존의 항생제 대체제로서 이용 가능성이 확인되었다(Han 등, 2010b). 봉독은 축산물에서 항생제의 남용으로 인한 내성균 발생으로 항생제의 효력 저하뿐만 아니라 잔류된 항생제가 인체에까지 축적이 되는 심각한 문제를 극복함으로써 안전한 고품질의 축산물 생산을 가능하게 할 수 있는 새로운 항생제 대체제 및 면역촉진제로서 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 국내에서 채취한 정제봉독을 이용한 사료첨가제 또는 동물의약품의 원료로 사용하기 위한 정제봉독의 기원 및 지표성분을 제시하고자 하였다. 본 연구 결과를 통해 봉독채집장치를 사용하여 봉독을 채취하는 양봉농가에서 사육하는 꿀벌은 서양종꿀벌

이탈리안품종으로 확인되었다. 꿀벌의 품종 구분을 위해 사용한 COI 유전자는 미토콘드리아 유전체를 구성하는 다양한 유전체 중에서 비교적 빠른 진화율을 보이고 있어 생물종들 간의 분자 계통, 특정 종을 구성하는 개체군들 간의 유전적 변이, DNA 바코드 제작 등과 같은 연구에 널리 활용되고 있다. 이는 국내에서 인체 및 동물약품으로 허가, 판매되고 있는 수입산 봉독의 기원과 일치하는 결과를 보였다. 또한 봉독의 주요성분인 멜리틴의 함량에 있어서도 기존의 연구보고와 같이 43~78% 범위 내에 존재하였다. 멜리틴은 봉독의 항균 및 항염증 효과를 나타내는 주요물질로 알려져 있다. 자연상태에서도 멜리틴의 함량은 채집시기, 지역에 따라 다소 차이를 보이나, 특히 봉독채집장치를 사용하여 채취한 봉독을 정제하는 과정에서 봉독의 성분에 변화를 초래하는 경우가 빈번하다. 따라서 봉독채집장치를 사용하여 채집한 봉독을 정제한 이후 정제봉독에서의 멜리틴 함량은 천연항생제로 사용하는데 있어 매우 중요한 지표가 된다. 본 연구 결과를 통해 가축용 동물항생제로 봉독을 사용하기 위해서는 멜리틴 함량이 41~70% 범위로 한정하고자 한다. 본 연구에서 제시한 멜리틴 함량의 범위에서의 봉독은 기존의 항생제로 사용되는 penicillin 보다 강하거나 유사한 항균력을 갖는 것으로 확인되었다. 국내산 정제봉독의 물리적 구조 및 열적특성으로 시차열 분석을 통해 230°C 부근에서 degradation 흡열 피크가, 1,500~1,600 cm<sup>-1</sup> 대에서 double peak을 보여 peptide 구조 특성을 적외선 분광광도 분석을 통해 확인되었다. X선 회절 분석을 통해 2θ=8.5° 부근과 2θ=21.5° 부근에서 규칙적인 배열의 결정 피크를 보이는 봉독의 구조적 특성을 확인하였다.

이러한 결과로 미루어 사료첨가제 또는 동물약품 원료로 국내산 정제봉독을 사용할 경우 서양종꿀벌 이탈리안계통 일벌로부터 채취한 봉독으로, 멜리틴 함량은 41~70% 범위에서, 물리적 구조 및 열적 특성이 안정화된 정제봉독을 사용하고자 제시한다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ00951903)에 의하여 수행되었습니다.

## 참고 문헌

- 김문호. 1992. 봉독요법과 봉침요법. 한국교육기획. 서울:67-141.
- 한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용. 2007. 봉독 간이정제법. 특허 제 10-0758814호
- Burgat V. 1991. Residues of drugs veterinary use in food. Rev Pract 41: 985-990
- Choi SH, Cho SK, Cul XS, Kang SS, Kwan YB. 1999. The Therapeutic Effect of Piglets with Bacterial Diarrhea by Natural Honeybee (*Apis mellifera*) Venom. Korean J Vet Clin Med 16(1): 150-154.
- Curcio-Vonlanthen V, Schneider CH, Frutig K, Blaser K, Kalbacher H. 1997. Molecular parameters in melittin immunogenicity. J Pept Sci 3(4): 267-276.
- Jung SC. 2006. Establishment of control system of antibiotics for livestock. National Veterinary Research and Quarantine Service and Korea Food & Drug Administration. 8-12.
- Habermann E, Reiz KG. 1965. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. Biochem Z 343(2): 192-203.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Kim BS, Kim JY, Baek HJ, Kim ST. 2007. Antibacterial activity of the honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting dairy cows. Int J Indust Entomol 14(2): 137-142.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009a. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. Am J Chin Med 37(2): 833-842.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009b. Somatic cell count in milk of bee venom treated dairy cows with mastitis. J ApiProduct ApiMed Sci 1(4): 104-109.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim BS, Lee W, Baek HJ, Kim ST, Hwang SJ, Pak SC. 2010a. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. Poult Sci 89: 2396-2400.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim ST. 2010b. Effects of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on the reproductive efficiency of dams and the growth performance, disease occurrence of Hanwoo calves. Korean J Vet Serv 33(3): 287-292
- Hays VW, Muir WM. 1979. Efficiency and safety of feed additive use of antibacterial drugs in animal production. Can J Anim Sci 59: 447-456.
- Kim SJ, Park JH, Kim KH, Lee WR, An HJ, Min BK, Han SM, Kim KS, Park KK. 2012. Apamin inhibits THP-1-derived macrophage apoptosis via mitochondria-related apoptotic pathway. Exp Mol Pathol 93: 129-134.
- Lin JH, Rogers PAM. 1980. Acupuncture effects on the body's defense systems. Vet Bull 50: 633-640.
- Lin YC. 1987. Observation of therapeutic effects of acupuncture treatment in 170 cases of infantile diarrhea. J Tradit Chin Med 7(3): 203-204.

- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene; evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5(3): 153-165.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Piek T. 1986. *Venoms of the Hymenoptera*. Academic press, London. United Kingdom
- Vick JA, Shipman WH. 1972. Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon* 10(4): 377-380.
- Wu M, Hancock RE. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide batenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem.* 274(1): 29-35.